

学位論文審査結果の報告書

氏 名 吳 姝嫻

生 年 月 日 昭和・平成 62 年 12 月 26 日

本 籍 (国籍) 中華民国

学位の種類 博 士 (工 学)

学位記番号 第 号

学位授与の条件 学位規程第 5 条該当
(博士の学位)

論 文 題 目 Identification and Physiological Activities of
Organic Compounds Produced from Natural Product Resources,
and Effective Utilization of the Resources

審 査 委 員

(主 査) 野村 正人



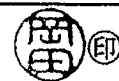
(副主査) 白石 浩平



(副主査) 伊藤 一明



(副 査) 岡田 芳治



(副 査)



論文内容の要旨

古代中国の神農伝説では、人類が「百薬をなめて薬草を見分け医薬の道を開いた」と言われている。植物を対象とした天然資源を利用する利点は、古くから人類が長く利用してきたものであり、薬用として利用する際には生体に対し植物そのものを利用した場合は有効成分以外の複数の成分が混在することにより、合成薬品を服用する場合と比べてその作用は緩和されたものであり、相乗効果あるいは相加効果なども期待されるなどの貴重な情報をもたらしている。また、天然資源である植物は産地、季節の変化、生理変種、あるいは感染による変動などによる生育環境の変化・影響により含有成分の不均質性(品質低下)に影響を及ぼしていることが考えられる。しかし、植物が生産する目的以外の成分については自然に返すことにより環境に優しいものと考えられている。一方、近年新たな有効成分の抽出方法、分画法の確立、分析機器の開発により構造の解明が進み合成研究の完成によって得られる化合物は、さまざまな生理活性試験法が新たに確立されるようになり、その活性の有無が明らかにされるようになってきており、多くの貴重な情報から合成医薬品の先導化合物となり得る情報をもたらしている。これら化合物はそれぞれの植物での光合成によって二次代謝産物としてもたらされるものであり植物固有の成分組成に含まれている化合物である。最近の温暖化による地球環境の変化にともない、貴重な有効資源である植物を介して入手してきた成分を安定的に人類の医療への応用、活用することは、今後十分にできなくなる可能性が考えられる。また、今後増加する人類の人口を支える食材として生産されている穀物、野菜、果物などの確保も非常に厳しい環境下にあるものと考えられる。学位論文申請者の研究内容は、これらのことを踏まえて中華人民共和国(中国)、韓国及び日本などの東アジアの温帯からヒマラヤなどの極寒の地にも分布し、人々の体調が悪く感じた時に食用として用いられている地衣類の一つでイワタケ科の岩耳(岩茸: *Gyrophora esculenta*)の有効成分を特定し、本論文では、新たな生理活性を発現する新規の先導化合物への誘導を行った。また、生産地域によっては高価な特産物の果物として取り扱われているが加工された後、その多くは産業廃棄物として処理されているマンゴー(英名;Mango、学名;*Mangifera indica* L.)の種子中に含まれる油脂成分の工業的活用についての研究開発を行ったものである。本論文は、次の第一章及び第二章で構成されている。

第一章では、高山などの厳しい環境下で生育し、希少価値が高く高級珍味である岩耳は、最近の研究において、生活習慣病である高血圧あるいは高コレステロールに対して抑制効果があると言われている。そこで、入手した岩耳に含まれている化学成分の検索を行った。すなわち、岩耳のメタノール粗抽出油を種々の溶媒で分画後、抗酸化能活性の有無では活性酸素阻害試験を行ったところ、エーテル部及び酢酸エチル部に活性があることを見出し、その活性は比較物質であるアスコル

ビン酸よりも高い阻害率であり、活性発現に関与している化合物として2,4-ジヒドロキシ-6-メチル安息香酸メチルであることを明らかにした。また、その関連化合物である2,4-ジヒドロキシ安息香酸メチル、2-ヒドロキシ-4-安息香酸メチル、2,4-ジメトキシ安息香酸メチル及び4-ヒドロキシ-2-メトキシ安息香酸メチルを合成し、官能基の相違による抗酸化能活性発現への影響を検討したところ、活性メカニズムとしてC₂位とC₄位のヒドロキシル基が関与していることを明らかにするとともに、C₄位のヒドロキシル基がキノン構造を形成することで活性発現に大きく関与しているものと考察した。一方、ヒト由来肺胞上皮Ⅱ型細胞A549による細胞毒性とサイトカイン生産抑制効果、及びラット腹腔マスト細胞を用いたヒスタミン遊離抑制効果について検討を行ったところ、2,4-ジヒドロキシ-6-メチル安息香酸メチル及び4-ヒドロキシ-2-メトキシ安息香酸メチルには細胞毒性ならびに炎症性サイトカインであるIL8の生産抑制効果はないことを明らかにした。また、ヒスタミン遊離抑制効果の発現にはC₂位とC₄位のヒドロキシル基が*m*-配位で存在することにより発現し、しかも濃度依存的に関与していることを確認した。このことから、地衣類である岩耳は薬用資源としての有効成分が含まれており、健康の維持増進、または生活習慣病を予防する機能性食品の素材としての利用が期待されるものと考察した。第二章では、果物であるマンゴーの果汁生産後に食品廃棄物として処理されている種子中に含まれる油脂成分の工業的活用について検討している。多年生のマンゴーはウルシ科の常緑高木で北インド地方あるいはマレー半島が原産であり、熱帯地域で広く栽培されている。日本では環境や消費者の嗜好にあった品種改良が行われ、主にアーウィン種(通常アップルマンゴー)が沖縄県(約80%)、鹿児島県、宮崎県、福岡県及び和歌山県で生産されている。本論文で使用したマンゴー種子は入手容易な宮崎産ならびに産地の異なる台湾産であり脂肪酸組成を検討したところ、6種類の脂肪酸を確認することができ、宮崎産ではパルミチン酸が6.5%、パルミトレイン酸0.2%、ステアリン酸が39.8%、オレイン酸が46.1%、リノール酸が4.7%、リノレン酸が1.8%であり、台湾産ではパルミチン酸が7.1%、ステアリン酸が40.1%、オレイン酸が43.7%、リノール酸が5.2%、リノレン酸が2.4%含まれていることを分析し確認した。これらを各種の植物油脂と比較すると、化粧品などに利用されているシアバターに近い脂肪酸組成(パルミチン酸;5.7~8.5%、ステアリン酸;35.9~41.4%、オレイン酸;49.0~49.9%、リノール酸;4.3~5.3%)であることを確認している。このことから、マンゴー種子油は化粧品への利用が期待できるものと考え、入手容易な宮崎産マンゴー種子油の不けん化定量(%)、けん化価、酸化(mg・KOH/g)及びヨウ素価(g/100g oil)の物性(1.6、185.6、3.4、45.9)を求めたところ、シアバター(2~11、178~196、-、49~67)に近い物性を持っており、とくにヨウ素価値が低いことから変敗を受け難い油脂であることを明らかにした。つぎに、化粧品への利用を考慮し、10種類の臭い成分に対する消臭試験を行ったところ、身

近な臭いである加齢臭の原因である2-ノネナールに対して70%以上の値を示し、また、足の臭いの原因であるイソ吉草酸に対しても70%の消臭効果が発現することを確認した。その消臭効果を検討したところ、観賞用の植物や海魚、甲殻類の腐敗によって生成するトリメチルアミンに対して、オレイン酸を主成分とした混合系では消臭率98%以上の値が得られた。また、2-ノネナールに対してはリノール酸の添加割合を増加することにより90%以上の消臭効果が発現した。これらの結果から、中和剤としてマンゴー種子中の脂肪酸と反応することにより、臭いのない物質あるいは嗅覚閾値が高い物質に変化したものと考えている。このことを踏まえて、消臭効果がある化粧品乳液の試作を行い、市販品のオリーブ油を主体とした乳液と比較したところ、ボランティアによる調査では粘性が強く、滑らかなクリーム状でしっとり感のあり、保湿度が高いなど化粧品原料としての高評価を得ている。また、石鹸としての物性(オリーブ石鹸と比較)を測定し、泡立ち及び消泡効果に特徴を確認することができたことから、化粧品の中でも口紅の汚れ及び食品の汚れとしてお好みソースを用いて布洗浄効果を検討したところ、オリーブ石鹸よりも著しい洗浄効果があることを明らかにした。その効果として、マンゴー種子油の油脂成分が洗浄力の高いステアリン酸及びオレイン酸が主成分であることが大きな影響を及ぼしているものと考察した。一方、マンゴーの部位によっては、腰痛、気管支炎などの治療に用いられており、鎮痛作用、抗炎症作用、免疫調節作用などの生理活性があるが種子中の脂質成分が持つ新たな生物活性性については検討されておらず、商業的利用は未だ手つかずである。また、オレイン酸を主体とする油脂としてオリーブオイルがあり、閉経後の女性において摂取することで乳癌のリスクが減少することが示されており、オリーブオイルを多用する伝統的な地中海の食事との関係が指摘され、油脂は悪性腫瘍の発生を抑制する因子となり得ることが示されている。そこで、すでにマンゴー種子由来の油脂には主成分としてオレイン酸が存在していることに着目し、未利用資源であるマンゴー種子由来の油脂の新たな用途を検討する目的で子宮頸癌由来のHeLa細胞を用いた抗腫瘍活性を検討し、マンゴー種子由来の油脂はHeLa細胞に対して濃度依存的な増殖活性を示すことを明らかにした。このことは油脂による細胞増殖活性はトリグリセリドがHeLa細胞に直接作用している可能性があり、油脂がHeLa細胞のlipoprotein lipaseによって分解され、脂肪酸として作用するメカニズムを提唱した。また、マンゴー種子由来の油脂が腫瘍細胞の悪性度を亢進させることで細胞増殖を促しているか否かを解明するために、iTRAQを用いた発現差異プロテオミクス解析を行ったところ、73個のタンパク質が同定され、マンゴー種子由来の油脂の処置で最も発現亢進が顕著であったタンパク質はHMGN2であり、コントロール群に対して25.06倍の発現亢進であるが、細胞の核内では細胞の機能維持に寄与している一方で、細胞外から作用させるとT24細胞や口腔扁平上皮癌細胞に対する増殖抑制作用が示されたことを確認した。なお、HMGN2はHigh mobility group Nファミリーを構成するタンパクの一つであり、クロマチンの構成単位であるヌクレオソームに特異的に結合する非ヒストンタンパク質である。このように、マンゴー種子由来の油脂のHeLa細胞に対する増殖活性亢進作用を明らかにし、プロテオミクスを用いた網羅的な解析により悪性度の亢進にともなう増殖でない可能性が高いことを確認した。

論文審査結果の要旨

植物を対象とした天然資源を利用する利点は、古くから人類が長く利用してきたものであり、薬用として利用する際には生体に対し植物そのものを利用した場合は有効成分以外の複数の成分が混在することにより、合成薬品を服用する場合と比べてその作用は緩和されたものであり、相乗効果あるいは相加効果なども期待されるなどの貴重な情報をもたらしている。また、天然資源である植物は産地、季節の変化、生理変種、あるいは感染による変動などによる生育環境の変化・影響により含有成分の不均質性(品質低下)に影響を及ぼしていることが考えられる。しかし、植物が生産する目的以外の成分については自然に返すことにより環境に優しいものと考えられている。一方、近年新たな有効成分の抽出方法、分画法の確立、分析機器の開発により構造の解明が進み合成研究の完成によって得られる化合物は、さまざまな生理活性試験法が新たに確立されるようになり、その活性の有無が明らかにされるようになってきており、多くの貴重な情報から合成医薬品の先導化合物となり得る情報をもたらしている。これら化合物はそれぞれの植物での光合成によって二次代謝産物としてもたらされるものであり植物固有の化合物である。これらのことを踏まえて、学位論文申請者の研究内容は中華人民共和国(中国)、韓国及び日本などの東アジアの温帯からヒマラヤなどの極寒の地にも分布し、人々の体調が悪いと感じた時に食用として用いられている地衣類の一つでイワタケ科の岩耳(岩茸: *Gyrophora esculenta*)の有効成分を特定し、本論文では、新たな生理活性を発現する新規の先導化合物への誘導を行った。また、生産地域によっては高価な特産物の果物として取り扱われているが加工された後、その多くは産業廃棄物として処理されているマンゴー(英名:Mango、学名:*Mangifera indica* L.)の種子中に含まれる油脂成分の工業的活用に関わる研究を行ったものである。まず、高山などの厳しい環境下で生育し、希少価値が高く高級珍味である岩耳は、最近の研究において、生活習慣病である高血圧あるいは高コレステロールに対して抑制効果があると言われている。そこで、入手した岩耳に含まれている化学成分の検索を行っている。すなわち、岩耳のメタノール粗抽出油を種々の溶媒で分画後、抗酸化能活性の有無では活性酸素阻害試験を行ったところ、エーテル部及び酢酸エチル部に活性があることを見出し、その活性は比較物質であるアスコルビン酸よりも高い阻害率であり、活性発現に関与している化合物として2,4-ジヒドロキシ-6-メチル安息香酸メチルであることを明らかにしている。また、その関連化合物である2,4-ジヒドロキシ安息香酸メチル、2-ヒドロキシ-4-安息香酸メチル、2,4-ジメトキシ安息香酸メチル及び4-ヒドロキシ-2-メトキシ安息香酸メチルを合成し、官能基の相違による抗酸化能活性発現への影響を検討したところ、活性メカニズムとしてC₂位とC₄位のヒドロキシル基が関与していることを明らかにするとともに、C₄位のヒドロキシル基がキノン構造を形成することで活性発現に大きく関与しているものと考察している。一方、ヒト由来肺胞上皮Ⅱ型細胞A549による細胞毒性とサイトカイン生産

抑制効果、及びラット腹腔マスト細胞を用いたヒスタミン遊離抑制効果について検討を行ったところ、2,4-ジヒドロキシ-6-メチル安息香酸メチル及び4-ヒドロキシ-2-メトキシ安息香酸メチルには細胞毒性ならびに炎症性サイトカインであるIL8の生産抑制効果はないことを明らかにしている。また、ヒスタミン遊離抑制効果の発現にはC₂位とC₄位のヒドロキシル基が*m*-配位で存在することにより発現し、しかも濃度依存的に関与していることを確認している。このことから、地衣類である岩耳は薬用資源としての有効成分が含まれており、健康の維持増進、または生活習慣病を予防する機能性食品の素材としての利用が期待されるものと考察している。

つぎに、果物であるマンゴーの果汁生産後に食品廃棄物として処理されている種子中に含まれる油脂成分の工業的活用について検討している。多年生のマンゴーはウルシ科の常緑高木で北インド地方あるいはマレー半島が原産であり、熱帯地域で広く栽培されている。日本では環境や消費者の嗜好にあった品種改良が行われ、主にアーウィン種(通常アップルマンゴー)が沖縄県(約80%)、鹿児島県、宮崎県、福岡県及び和歌山県で生産されている。本論文で使用したマンゴー種子は入手容易な宮崎産ならびに産地の異なる台湾産であり脂肪酸組成を検討したところ、6種類の脂肪酸を確認することができ、宮崎産ではパルミチン酸が6.5%、パルミトレイン酸0.2%、ステアリン酸が39.8%、オレイン酸が46.1%、リノール酸が4.7%、リノレン酸が1.8%であり、台湾産ではパルミチン酸が7.1%、ステアリン酸が40.1%、オレイン酸が43.7%、リノール酸が5.2%、リノレン酸が2.4%含まれていることを分析し確認している。これらを各種の植物油脂と比較すると、化粧品などに利用されているシアバターに近い脂肪酸組成(パルミチン酸;5.7~8.5%、ステアリン酸;35.9~41.4%、オレイン酸;49.0~49.9%、リノール酸;4.3~5.3%)であることを確認している。このことから、マンゴー種子油は化粧品への利用が期待できるものと考え、入手容易な宮崎産マンゴー種子油の不けん化定量(%), けん化価、酸化(mg・KOH/g)及びヨウ素価(g/100g oil)の物性(1.6, 185.6, 3.4, 45.9)を求めたところ、シアバター(2~11, 178~196, —, 49~67)に近い物性を持っており、とくにヨウ素価値が低いことから変敗を受け難い油脂であることを明らかにしている。そこで、化粧品への利用を考慮し、10種類の臭い成分に対する消臭試験を行ったところ、身近な臭いである加齢臭の原因である2-ノネナールに対して70%以上の値を示し、また、足の臭いの原因であるイソ吉草酸に対しても70%の消臭効果が発現することを確認している。さらに、高い消臭活性をとまなう天然物由来の消臭剤開発を目的として、マンゴー種子中に含まれている脂肪酸(パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸及びリノレン酸)を任意の割合で混合し、その消臭効果を検討したところ、観賞用の植物や海魚、甲殻類の腐敗によって生成するトリメチルアミンに対して、オレイン酸を主成分とした混合系では消臭率98%以上の値を得ている。また、2-ノネナールに対してはリノール酸の添加割合を増加することにより90%以上の消臭効果が発現していることを確認している。こ

これらの結果から、中和剤としてマンゴー種子中を確認している。これらの結果から、中和剤としてマンゴー種子中の脂肪酸と反応により、臭いのない物質あるいは嗅覚閾値が高い物質に変化したものと考察している。このことを踏まえて、消臭効果がある化粧品乳液の試作を行い、市販品のオリーブ油を主体とした乳液と比較したところ、ボランティアによる調査では粘性が強く、滑らかなクリーム状でしっとり感のあり、保湿力が高いなど化粧品原料としての高評価を得ている。また、石鹸としての物性(オリーブ石鹸と比較)を測定し、泡立ち及び消泡効果に特徴を確認することができたことから、化粧品の中でも口紅の汚れ及び食品の汚れとしてお好みソースを用いて布洗浄効果を検討したところ、オリーブ石鹸よりも著しい洗浄効果があることを明らかにしている。その効果として、マンゴー種子油の油脂成分が洗浄力の高いステアリン酸及びオレイン酸が主成分であることが大きな影響を及ぼしているものと考察している。

一方、マンゴーの部位によっては、腰痛、気管支炎などの治療に用いられており、鎮痛作用、抗炎症作用、免疫調節作用などの生理活性があるが種子中の脂質成分が持つ新たな生物活性については検討されておらず、商業的利用は未だ手つかずである。また、オレイン酸を主体とする油脂としてオリーブオイルがあり、閉経後の女性において摂取することで乳癌のリスクが減少することが示されており、オリーブオイルを多用する伝統的な地中海の食事との関係が指摘され、油脂は悪性腫瘍の発生を抑制する因子となり得ることが示されている。そこで、すでにマンゴー種子由来の油脂には主成分としてオレイン酸が存在していることに着目し、未利用資源であるマンゴー種子由来の油脂の新たな用途を検討する目的で子宮頸癌由来のHeLa細胞を用いた抗腫瘍活性を検討し、マンゴー種子由来の油脂はHeLa細胞に対して濃度依存的な増殖活性を示すことを明らかにしている。このことは油脂による細胞増殖活性はトリグリセリドがHeLa細胞に直接作用している可能性があり、油脂がHeLa細胞のlipoprotein lipaseによって分解され、脂肪酸として作用するメカニズムを提唱している。また、マンゴー種子由来の油脂が腫瘍細胞の悪性度を亢進させることで細胞増殖を促しているか否かを解明するために、iTRAQを用いた発現差異プロテオミクス解析を行ったところ、73個のタンパク質が同定され、マンゴー種子由来の油脂の処置で最も発現亢進が顕著であったタンパク質はHMGN2であり、コントロール群に対して25.06倍の発現亢進であるが、細胞の核内では細胞の機能維持に寄与している一方で、細胞外から作用させるとT24細胞や口腔扁平上皮癌細胞に対する増殖抑制作用が示されたことを確認している。なお、HMGN2はHigh mobility group Nファミリーを構成するタンパクの一つであり、クロマチンの構成単位であるヌクレオソームに特異的に結合する非ヒストンタンパク質であることを確認している。このように、マンゴー種子由来の油脂のHeLa細胞に対する増殖活性亢進作用を明らかにし、プロテオミクスを用いた網羅的な解析により悪性度の亢進にともなう増殖でない可能性が高いことを確認している。

以上のように、本論文ではこれまでほとんど成分が明らかにされなかった岩耳の成分分析と活性発現の成分を特定し、活性発現が期待される類縁化合物についても合成し、機能性食品の素材として成り得ることを明らかにしている。また、マンゴー種子の工業的利用について、多くの新たな知見を見出しており、有益な天然物由来の素材であることを明らかにしている。このように、本論文の研究内容は今後の天然物資源を原料とした有効活用への指針を示しており、技術的にも学術的にも有意義なものである。よって、本論文は博士(工学)の学位論文に値すると認められる。